BANG07-02
BANG07-05
Philadelphia Oligomix Alert Kit

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «**PHILADELPHIA oligomix Alert kit**» é um teste qualitativo de amplificação dos ácidos nucleicos para a **pesquisa do cDNA do rearranjo BCR-ABL, translocação t(9;22), cromossomo *Philadelphia*, variante P210 (P210), variante P190 (P190) e variante P230 (P230)** no produto da reação de transcrição reversa obtido pelo RNA total extraído das amostras de sangue periférico colhido em EDTA, sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio, suspensões de linfomonócitos e suspensões de leucócitos.

O produto é empregado, juntamente aos dados clínicos e a outros exames de laboratório, no diagnóstico e na monitoração da afecção mínima que persiste nos pacientes afetados por leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia mieloide aguda (LMA).

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O procedimento prevê a execução de três tipos de reações de amplificação, P210, P190 e ABL com um termociclador programável.

A reação P210 prevê duas reações sucessivas de amplificação (nested) específicas para os cDNA originados do rearranjo BCR-ABL, variante P210 (b3a2, b2a2, b2a3 e b3a3) e está em condições de evidenciar também os cDNA originados do rearranjo BCR-ABL, variante P230 (c3a2).

A reação P190 prevê duas reações sucessivas de amplificação (nested) específicas para o cDNA originado do rearranjo BCR-ABL, variante P190 (e1a2).

A reação ABL prevê uma única reação de amplificação específica para o cDNA originado do gene ABL que é utilizada como controle de idoneidade da amostra.

No caso das reações P210 e P190, uma primeira reação de amplificação específica para uma região do cDNA de BCR-ABL é realizada no primeiro tubo, partindo do produto da reação de transcrição reversa obtido do RNA extraído das amostras em exame. Em seguida, uma segunda reação de amplificação, específica para a região do cDNA, é realizada no segundo tubo, partindo do produto da primeira reação de amplificação.
A presença dos produtos específicos da segunda reação de amplificação indica a presença do DNA de BCR-ABL no produto da reação de transcrição reversa e, portanto, na amostra em exame.

No caso da reação ABL, a reação de amplificação específica para uma região do cDNA de ABL é realizada no primeiro tubo, partindo do produto da reação de transcrição reversa obtido do RNA extraído das amostras em exame.

A presença do produto específico da amplificação de controle indica a presença do cDNA de ABL no produto da reação de transcrição reversa e, portanto, a idoneidade da amostra em exame.

MATERIAIS FORNECIDOS

- **P210 OligoMIX e P190 OligoMIX de primeira amplificação**

Misturas otimizadas de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em solução estabilizada, **pré-aliquotada em tubos «*monotest*» prontos para o uso**. Cada tubo contém 40 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

- **P210 OligoMIX é aliquotada em tubos «monotest» AZUIS.**
- **P190 OligoMIX é aliquotada em tubos «monotest» NEUTROS.**

As misturas de reagentes fornecem os oligonucleotídeos primers da primeira amplificação, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

No caso de **P210 OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para os cDNA **P210** e **P230**.

No caso de **P190 OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para o cDNA **P190**.

- **P210 OligoMIX e P190 OligoMIX de segunda amplificação**

Misturas otimizadas de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em solução de estabilização, **pré-aliquotada em tubos «*monotest*» prontos para o uso**. Cada tubo contém 44 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

- **P210 OligoMIX é aliquotada em tubos «monotest» VERMELHOS.**
- **P190 OligoMIX é aliquotada em tubos «monotest» VERDES.**

As misturas de reagentes fornecem os oligonucleotídeos primers da segunda amplificação, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

No caso de **P210 OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para os cDNA **P210** e **P230**.

No caso de **P190 OligoMIX**, os oligonucleotídeos primers são específicos para o cDNA **P190**.

- **ABL OligoMIX para a amplificação de controle**

Uma mistura otimizada de reagentes para a amplificação dos ácidos nucleicos em uma solução de estabilização, **pré-aliquotada em tubos «*monotest*» AMARELOS prontos para o uso**. Cada tubo contém 40 µL de solução e 50 µL de óleo de vaselina.

A mistura de reagentes fornece os oligonucleotídeos primers da amplificação de controle, o sistema tampão, o cloreto de magnésio e os nucleotídeos trifosfatos.

Os oligonucleotídeos primers são específicos para o cDNA **ABL**.

O kit permite efetuar **25 reações**, controles positivos e negativos incluídos.

BANG07-02 /05

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
P210 OligoMIX de primeira amplificação	Mistura de amplificação em tubos AZUIS de 0,2 ou 0,5 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos externos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina
P190 OligoMIX primeira amplificação	Mistura de amplificação em tubos NEUTROS de 0,2 ou 0,5 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos externos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina
ABL OligoMIX amplificação de controle	Mistura de amplificação em tubos AMARELOS de 0,2 ou 0,5 mL	25 x 90 µL	Oligonucleotídeos, Cloreto de potássio, TRIS base,TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina
P210 OligoMIX de SEGUNDA amplificação	Mistura de amplificação em tubos VERMELHOS de 0,2 ou 0,5 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos internos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina
P190 OligoMIX SEGUNDA amplificação	Mistura de amplificação em tubos VERDES de 0,2 ou 0,5 mL	25 x 94 µL	Oligonucleotídeos internos, Cloreto de potássio, TRIS base, TRIS cloridrato, Triton X-100, Cloreto de magnésio, Desoxinucleotídeos trifosfatos, óleo de vaselina

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 – 14.000 RPM).
- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Termociclador programável, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes para a extração do RNA das amostras a analisar, para a transcrição reversa do RNA, para o controle positivo de amplificação e para a detecção do DNA amplificado **não** estão incluídos neste kit. Para realizar esta fase analítica aconselha-se a utilização dos seguintes produtos acessórios produzidos por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.:

- «**EXTRAzol®**» (código EXTR01), kit de extração do RNA das amostras celulares e não celulares; o kit permite efetuar 50 extrações.
- «**RT - Kit plus**» (código BRK200), kit de transcrição reversa do RNA com "random primer"; o kit permite realizar 50 reações.
- «**PHILADELPHIA - Positive Control**» (código CTRG07), controle positivo de amplificação de DNA plasmídico; o produto fornece controle para 25 sessões.
- «**DNA polymerase 2U / µL**» (código ER40 e ER140), enzima DNA polimerase termoestável para a amplificação dos ácidos nucleicos; os produtos permitem realizar 125 reações.
- «**ELETROFORESE 3**» (código EPH03), detecção do DNA amplificado por eletroforese em gel de agarose; o kit permite realizar 120 detecções.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Advertências e precauções específicas para os componentes

Os tubos que contenham os **OligoMIX** para a **primeira amplificação**, para a **segunda amplificação** e para a **amplificação de controle** são descartáveis e, portanto, devem ser utilizados uma única vez em reações de amplificação.

Os **OligoMIX** para a **primeira amplificação**, para a **segunda amplificação** e **para a amplificação de controle** apresentam os seguintes conselhos de prudência (S):

S 23-25. Não respirar gases/fumos/vapores/aerossol. Evitar o contato com os olhos.

Amostras e Controles

Amostras

Este kit deve ser utilizado com o produto da reação de transcrição reversa (**cDNA**) obtido do RNA extraído das seguintes amostras biológicas: sangue periférico colhido em EDTA, medula óssea colhida em EDTA ou citrato de sódio, suspensões de linfomonócitos e suspensões de leucócitos.

Sangue periférico colhido em EDTA e sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio

O sangue periférico colhido em EDTA ou sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio destinado à extração do RNA deve ser extraído segundo as indicações do laboratório, transportado a +2° / +8° C e conservado a +2° / +8° C por um máximo de quatro horas.

Quando se parte de sangue periférico ou medular é aconselhável realizar a separação dos linfomonócitos no Ficoll TM segundo as indicações do laboratório.

A quantidade ótima de leucócitos de onde extrai o RNA total é de aproximadamente 10.000.000 de células.

Não congelar o sangue periférico ou medular de modo a evitar a perda do RNA.

As instruções para a extração do RNA estão contidas no Manual de instruções para o uso do kit «**EXTRAzol®**».

Suspensões de linfomonócitos ou de leucócitos

As suspensões de linfomonócitos ou de leucócitos destinadas à extração do RNA devem ser preparadas segundo as indicações do laboratório, ressuspensas em Solução fisiológica estéril ou PBS estéril, contadas e conservadas a +2° / +8° C por um máximo de quatro horas.

A quantidade ótima de linfomonócitos ou de leucócitos de onde extrai o RNA total é de aproximadamente 10.000.000 de células.

Não congelar as suspensões de linfomonócitos e as suspensões de leucócitos de modo a evitar a perda do RNA.

As instruções para a extração do RNA estão contidas no Manual de instruções para o uso do kit «**EXTRAzol®**».

Substâncias interferentes

O cDNA deve ser obtido a partir do RNA que não contenha heparina, hemoglobina ou Ficoll™ para evitar fenômenos de inibição e a aparição de frequentes resultados não válidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenômenos de inibição por parte dos medicamentos antibióticos, antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.

Controles de amplificação

É absolutamente necessário confirmar cada sessão de amplificação preparando uma reação de controle negativo e uma reação de controle positivo.

Para o controle negativo utilizar água bidestilada estéril (não fornecida no kit) para acrescentar à reação no lugar do cDNA obtido da amostra.

Para o controle positivo utilizar o produto «**PHILADELPHIA - Controle Positivo**».

Controles de qualidade

É aconselhável confirmar o completo procedimento de análises de cada sessão, extração e amplificação, utilizando uma amostra negativa e uma amostra positivas já testadas ou do material de referência calibrado.

Nota sobre a reação de transcrição reversa

O produto «**RT - Kit plus**» é um sistema de transcrição reversa do RNA que utiliza os "random primer" para o primers da reação de polimerização, necessita a adição do RNA extraído em um volume de 10 µL e gera um volume final de 25 µL.

A quantidade ótima de RNA total que pode ser introduzida na reação de transcrição reversa com volume final de 25 µL é de aproximadamente 1 µg.

PROCEDIMENTO

Programação do ciclo térmico
(Para realizar na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:
- verificar que o bloco térmico do termociclador programável seja compatível com o formato dos **tubos «*monotest*»** incluídos no kit (tubos de 0,2 ou 0,5 mL);
- fazendo referência à documentação do equipamento, verificar a modalidade de controle da temperatura que o termociclador adepta para a execução do ciclo térmico;
- quando possível, selecionar a modalidade de **controle da temperatura diretamente no termociclador** (por exemplo, termociclador Hybaid™ ou Eppendorf™);
- quando não for possível (por exemplo, termociclador GeneAmp® PCR System da Applied Biosystems™), utilizar a modalidade de controle da temperatura pré-definida;
- quando solicitado, programar no termociclador o volume de reação de **100 µL**;
- programar no termociclador os parâmetros do ciclo térmico descritos nas tabelas seguintes.

Ciclo térmico da primeira amplificação		
Número de ciclos	**Temperaturas**	**Tempos**
1 ciclo	95°C	4 min.
35 ciclos	95°C	1 min.
	65°C	1 min.
	72°C	1 min.
1 ciclo	72°C	5 min.
Ciclo térmico da segunda amplificação		
Número de ciclos	**Temperaturas**	**Tempos**
1 ciclo	95°C	2 min.
30 ciclos	95°C	1 min.
	65°C	1 min.
	72°C	1 min.
1 ciclo	72°C	5 min.

Preparação da primeira amplificação
(Para realizar na área de extração / preparação da reação de amplificação)

Cada amostra requer o uso de um tubo. O kit permite efetuar 25 reações, P210, 25 reações P190, 25 reações ABL, controles positivos e negativos incluídos. O número mínimo de reações para uma sessão é nove: três reações P210 (controlo positivo, controlo negativo e amostra em análise), três reações P190 (idem como a primeira), três reações ABL (idem como a primeira).

Antes de iniciar a sessão é necessário:
- descongelar as amostras a ser analisadas, «**PHILADELPHIA - Positive Control**», centrifugá-las por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-las em gelo;

- descongelar um **tubo «*monotest*» AZUL (P210)** para qualquer das amostras a analisar, um para o controle negativo e um para o controle positivo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador permanente e mantê-los em gelo;
- descongelar um **tubo «*monotest*» NEUTRO (P190)** para qualquer das amostras a analisar, um para o controlo negativo e um para o controlo positivo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo;
- descongelar um **tubo «*monotest*» AMARELO (ABL)** para qualquer das amostras a analisar e um para o controlo negativo e um para o controlo positivo, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador indelével e mantê-los em gelo.

***NOTA:** Os **tubos «*monotest*»** são do tipo "a parede sutil" e devem ser manipulados com atenção para evitar a rotura. As centrifugações devem ser realizadas com os redutores apropriados quando seja necessário e segundo a modalidade estabelecida deste Manual de instruções para o uso.

- tomar a enzima «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugá-la por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-la em gelo;
- diluir como descrito na tabela a seguir à enzima «**DNA polimerase 2U / µL**» com água bidestilada estéril.

Preparar um volume de enzima diluída suficiente para todas as reações **P210**, **P190**, **ABL** previstas (controles incluídos) mais uma, para uma margem de segurança. A enzima diluída **não** pode ser conservada.

Número de reações	DNA Polimerase 2U/µL	Água	Volume total
4	2,0 µL	18,0 µL	20 µL
5	2,5 µL	22,5 µL	25 µL
6	3,0 µL	27,0 µL	30 µL
7	3,5 µL	31,5 µL	35 µL
8	4,0 µL	36,0 µL	40 µL
9	4,5 µL	40,5 µL	45 µL
10	5,0 µL	45,0 µL	50 µL
11	5,5 µL	49,5 µL	55 µL
12	6,0 µL	54,0 µL	60 µL
13	6,5 µL	58,5 µL	65 µL
14	7,0 µL	63,0 µL	70 µL
15	7,5 µL	67,5 µL	75 µL
16	8,0 µL	72,0 µL	80 µL
17	8,5 µL	76,5 µL	85 µL
18	9,0 µL	81,0 µL	90 µL
19	9,5 µL	85,5 µL	95 µL
20	10,0 µL	90,0 µL	100 µL
21	10,5 µL	94,5 µL	105 µL

1. Acrescentar a cada **tubo «*monotest*» AZUL (P210), NEUTRO (P190)** e **AMARELO (ABL) 5 µL** de enzima DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
2. Acrescentar a cada **tubo «*monotest*» AZUL, NEUTRO** e **AMARELO 5 µL** de cDNA obtido. Proceder do mesmo modo com o controle negativo e com o controle positivo.
3. Transferir os **tubos «*monotest*» AZUIS, NEUTROS** e **AMARELOS** no termociclador na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação e iniciar o ciclo térmico da primeira amplificação.

Preparação da segunda amplificação
(Para realizar na área de extração / preparação da reação de amplificação)

Antes de iniciar a sessão é necessário:
- tomar a enzima «**DNA pol. 2U / µL**», centrifugá-la por 5 segundos para levar ao fundo o conteúdo e mantê-la em gelo;
- descongelar tanto os **tubos «*monotest*» VERMELHOS (P210)** quanto os azuis, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador permanente e mantê-los em gelo;
- descongelar tanto os **tubos «*monotest*» VERDES (P190)** quanto os neutros, centrifugá-los* por 5 segundos para obter no fundo o conteúdo, marcá-los de modo reconhecível com um marcador permanente e mantê-los em gelo.

***NOTA:** Os **tubos «*monotest*»** são do tipo "a parede sutil" e devem ser manipulados com atenção para evitar a rotura. As centrifugações devem ser realizadas com os redutores apropriados quando seja necessário e segundo a modalidade estabelecida deste Manual de instruções para o uso.

- diluir como descrito na tabela anterior á enzima «**DNA pol. 2U / µL**» com água bidestilada estéril. Preparar um volume de enzima diluída suficiente para todas as reações **P210** e **P190** previstas (controles incluídos) mais uma, para uma margem de segurança. A enzima diluída **não** pode ser conservada.

4. Acrescentar a cada **tubo «*monotest*» VERMELHO (P210)** e **VERDE (P190) 5 µL** de enzima DNA polimerase termoestável diluída (1 U).
5. Acrescentar a cada **tubo «*monotest*» VERMELHO (P210) 1µL** de produto da primeira amplificação do correspondente **tubo «*monotest*» AZUL (P210)**.
6. Acrescentar a cada **tubo «*monotest*» VERDE (P190) 1µL** de produto da primeira amplificação do correspondente **tubo «*monotest*» NEUTRO (P190)**.

NOTA: O produto de amplificação da primeira reação pode contaminar os ensaios subsequentes. Isole o produto residual da primeira reação de amplificação e troque as luvas no final desta fase do procedimento.

7. Transferir os **tubos «*monotest*» VERMELHOS** e **VERDES** no termociclador na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação e iniciar o ciclo térmico da segunda amplificação.

NOTA: O produto de reação pode ser conservado a -20° C por um período máximo de um mês.

Detecção do produto específico de amplificação
(Para realizar na área de amplificação / detecção dos produtos de amplificação)

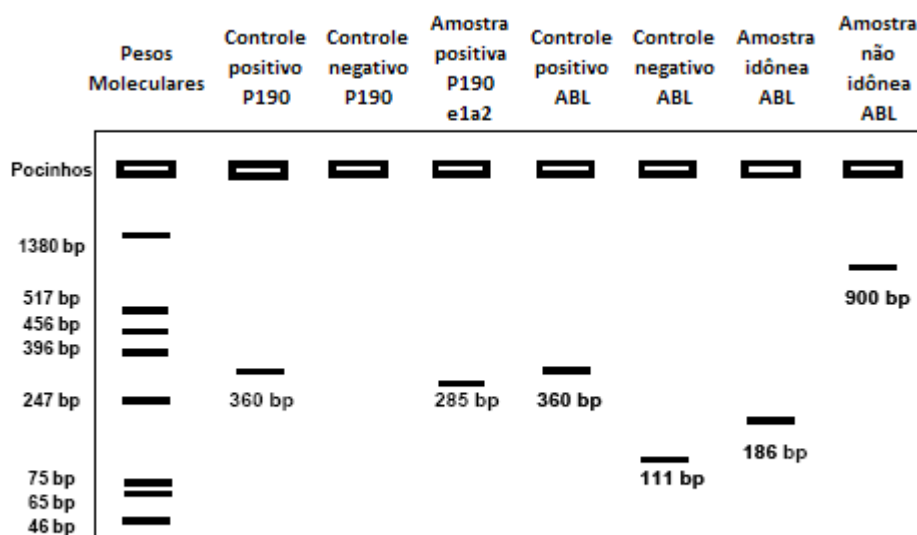
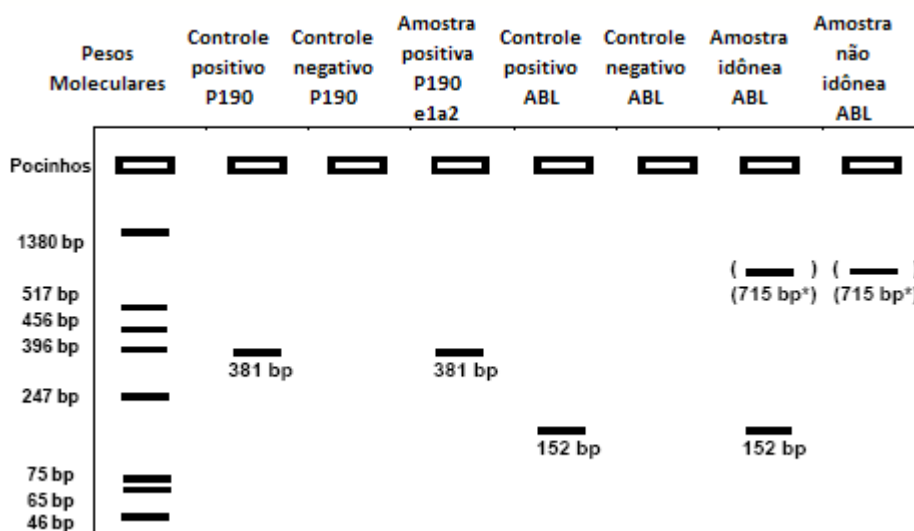
O produto específico da segunda amplificação pode ser detectado e identificado por meio de separação eletroforética, utilizando-se um gel de agarose com 4% de brometo de etídio 1 µg / mL em tampão TAE 1x(20 mM TRIS base, 20mM TRIS acetato, 1mM EDTA dissódico), como no produto «**ELECTROPHORESIS 3**».

Os produtos específicos da segunda amplificação P210 têm dimensões de:	**285 bp (P210 b2a2)** **360 bp (P210 b3a2)** **111 bp (P210 b2a3)** **186 bp (P210 b3a3)** **900 bp (P230 c3a2)**

O produto específico da segunda amplificação P190 tem dimensões de:	**381 bp (P190 e e1a2)**

O produto específico da amplificação ABL tem dimensões de:	**152 bp (ABL a2a3)**

NOTA: O produto da segunda amplificação pode contaminar os testes seguintes. Isolar o produto da segunda amplificação resíduo e os descartes de produtos na fase de detecção.

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação eletroforética dos produtos da segunda amplificação P210 que apresentam os diferentes perfis eletroforéticos, dos mais frequentes (P210 b3a2 e b2a2) aos mais raros (P210 b2a3 e b3a3 e P230 c3a2).

A título de exemplo, está reproduzida a seguir uma ilustração esquemática que representa o resultado da separação eletroforética dos produtos da segunda amplificação P190 e da reação ABL de controle.

*Em caso de coextração de DNA genômico com o RNA celular, é possível observar na amplificação de controle ABL um produto específico de amplificação de **715 bp**, constituído de parte do éxon a2, do íntron e de parte do éxon a3 do gene ABL.

NOTA: É possível detectar em amostras positivas para P210 analisadas com a reação de amplificação P190 os seguintes produtos específicos de amplificação que tem dimensões de **1884 bp** em amostras positivas P210 b3a2 e **1809 bp** em amostras positivas P210 b2a2.

NOTA: É possível detectar em amostras analisadas com a reação de amplificação P190 o produto específico de amplificação para a forma rara P190 e1a3 que tem dimensões de **207 bp**.

É necessário confirmar a identidade do produto da segunda amplificação de uma amostra, confrontando a sua migração no gel com a migração de um marcador de peso molecular e com a migração do produto da segunda amplificação do controle positivo.

A eventual presença de produtos não específicos de dimensões diferentes daquelas dos produtos específicos da segunda amplificação de uma amostra não tem nenhum significado em relação á pesquisa dos cDNA P210, P190 e P230 e do cDNA ABL.

Interpretação dos resultados

Os resultados das reações de controle negativo e de controle positivo são utilizados para confirmar a sessão de amplificação como descrito nas tabelas seguintes:

Amplificação dos controles negativos Produto específico P210, P190 ou ABL	Amplificação
AUSENTE	CORRETA

Amplificação dos controles positivos Produto específico P210, P190 ou ABL	Amplificação
PRESENTE	CORRETA

Se o produto específico de amplificação está presente em uma das reações de controle negativo, se são verificados problemas na fase de amplificação (contaminação) que podem causar resultados falsos positivos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Se o produto específico de amplificação está ausente em uma das reações de controle positivo, se são verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente) que podem causar resultados falsos negativos. A sessão não é válida e deve ser repetida a partir da fase de amplificação.

Este kit é capaz de detectar uma quantidade mínima de 10 pares de cDNA P210 o P190 por reação de amplificação.

Os resultados das reações relativas às amostras em análise são utilizados para avaliar a presença do cDNA de P210, P190 ou P230 como descrito na tabela seguinte:

Amplificações da amostra		Idoneidade da amostra	Resultado do teste	cDNA de P210, P190 ou P230
Produto específico P230, P190 ou P230	Produto específico ABL			
AUSENTE	AUSENTE	não idônea	não válido	-
	PRESENTE	idônea	válido, negativo	NÃO DETECTADO
PRESENTE	AUSENTE	idônea*	válido, positivo	PRESENTE
	PRESENTE	idônea	válido, positivo	PRESENTE

Se nas reações de uma amostra estão ausentes seja o produto específico de amplificação do cDNA P210, P190 e P230 seja o do cDNA ABL da amplificação de controlo, se são verificados problemas na fase de amplificação (amplificação não eficiente ou ausente), na fase de transcrição reversa (transcrição reversa não eficiente ou ausente) ou na fase de extração (perda de RNA, presença de inibidores, RNA da amostra alterado ou amostra de partida com um número de células insuficiente) que podem causar resultados falsos negativos. A amostra não é idônea, o teste não é válido e deve ser repetido a partir da extração de uma nova amostra.

Se na reação de uma amostra está ausente o produto específico de amplificação do cDNA P210, P190 ou P230 e está presente o do cDNA ABL da amplificação de controle, os cDNA P210, P190 ou P230não foram detectados no produto da transcrição reversa obtido do RNA extraído da amostra, mas não se pode negar que os cDNA P210, P190 ou P230 estejam presentes a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto. Neste caso o resultado será um falso negativo.

Os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

***NOTA:** Quando em uma reação de amplificação está presente o produto específico de amplificação dos cDNA P210, P190 ou P230 e o produto do cDNA ABL da amplificação de controle está ausente, a amostra é, de todo modo, idônea e o resultado positivo do teste é válido. No entanto, a reação de amplificação do cDNA ABL tem uma eficiência menor da reação de amplificação dos cDNA P210, P190 e P230 (nested).

Cálculo dos limites de detecção

O limite de detecção, quando se utiliza um método particular de extração e com referência a uma unidade de medida em particular, pode ser calculado a partir do limite de detecção da reação de amplificação segundo esta fórmula:

Limite de detecção = Fe x Ee Ft x Et x Fa x 10 cópias cDNA

Fe é a relação entre a unidade de medida de referência e a amostra usada na extração, por exemplo:

Kit de extração	Unidade de medida	Amostra em extração	Fe
«ExTRAzol®»	Cópias mRNA / 1.000.000 células	10.000.000 células	Fe = 10^6 c. / 10^7 c. = 0,1

Ee é o inverso da eficiência da extração, por exemplo:

Kit de extração	Eficiência da extração	Ee
«ExTRAzol®»	Eficiência mínima 80%, ou seja, 0,8	Ee = 1 / 0,8 = 1,25

Ft é a relação entre o volume do RNA extraído e o volume usado na reação de transcrição reversa, por exemplo:

Produto	Volume do RNA extraído	Volume em transcrição reversa	Ft
«RT - kit plus»	200 µL	10µL	Ft = 200µL / 10µL = 20

Et é o inverso da eficiência da reação de transcrição reversa, por exemplo:

Produto	Eficiência em transcrição reversa	Et
«RT - kit plus»	Eficiência mínima 50%, ou seja, 0,5	Ee = 1 / 0,5 = 2

Fa é a relação entre o volume do cDNA obtido e o volume usado na reação de amplificação, por exemplo:

Produto	Volume do cDNA	Volume em amplificação	Fa
«PHILADELPHIA oligomix Alert kit»	25 µL	5 µL	Fa = 25 µL / 5 µL = 5

Quando se utilizam os kits de extração da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A. o limite seria:

Produto	Limites de detecção
Nanogen	Limites de detecção = 250 cópias mRNA / 1.000.000 células

Limites do procedimento

Utilizar com este produto somente o cDNA obtido pela transcrição reversa do RNA extraído das seguintes amostras humanas: sangue periférico colhido em EDTA, sangue medular colhido em EDTA ou citrato de sódio, suspensões de linfomonócitos e suspensões de leucócitos.

Não utilizar com este produto cDNA obtido por transcrição reversa de RNA extraído das amostras heparinizadas: a heparina inibe as reações de transcrição reversa e de amplificação dos ácidos nucleicos e causa resultados não válidos.

Não utilizar com este produto cDNA obtido por transcrição reversa de RNA contaminado por hemoglobina ou Ficoll™: esta substância pode inibir as reações de transcrição reversa e de amplificação dos ácidos nucleicos e pode causar resultados não válidos.

Não estão disponíveis dados pertinentes a eventuais fenómenos de inibição por parte dos medicamentos antibióticos, antivirais, quimioterápicos ou imunossupressores.
Os resultados obtidos com este produto dependem da correta coleta, transporte, conservação e preparação das amostras; para evitar resultados incorretos, é necessário, portanto, ter particular atenção durante estas fases e seguir atentamente as instruções fornecidas com os produtos para a extração dos ácidos nucleicos.

O método de amplificação nested dos ácidos nucleicos utilizados neste produto, por causa da sua elevada sensibilidade analítica, está sujeito à contaminação por parte das amostras clínicas positivas para P210, P190 e P230, dos controles positivos e dos mesmos produtos da reação de amplificação. As contaminações levam a resultados falsos positivos. A modalidade de realização do produto pode limitar as contaminações; mas estes fenómenos podem ser evitados somente com uma boa prática das técnicas de laboratório e seguindo atentamente as instruções fornecidas neste manual.

Este produto requer pessoal instruído para a manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de preparações químicas classificadas como perigosos para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer roupas de trabalho e áreas de trabalho adequadas à manipulação de amostras biológicas que podem transmitir agentes infecciosos e de preparações químicas classificadas como perigosas para evitar incidentes com consequências potencialmente graves para o utilizador ou outras pessoas.

Este produto requer pessoal instruído para o procedimento de biologia molecular, como a extração, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos para evitar resultados incorretos.

Este produto requer uma área separada para a extração / preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Este produto requer o uso de roupas de trabalho e instrumentos destinados à extração / preparação das reações de amplificação e para a amplificação / detecção dos produtos de amplificação para evitar resultados falsos positivos.

Um resultado negativo obtido com este produto indica que os cDNA P210, P190 e P230 não foram detectados no produto da transcrição reversa obtido do RNA extraído da amostra, mas não se pode descartar que os cDNA P210, P190 e P230 estejam presentes a uma titulação inferior ao limite de detecção do produto (veja parágrafo Características da desempenho na página 14); neste caso o resultado será um falso negativo.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, os resultados obtidos com este produto devem ser interpretados considerando todos os dados clínicos e os outros exames de laboratório relativos ao paciente.

Como para qualquer outro dispositivo diagnóstico, existe um risco latente de obter resultados não válidos, falsos positivos e falsos negativos com este produto. Este risco resíduo não pode ser eliminado ou reduzido posteriormente. Este risco resíduo em situações particulares, como os diagnósticos de urgência, pode contribuir a decisões erradas com consequências graves para o paciente.

Sensibilidade analítica: limite de detecção das P210 OligoMIX e P190 OligoMIX

A sensibilidade analítica deste OligoMIX permite identificar a presença de aproximadamente 10 moléculas de DNA branco nos 5µL de cDNA produto da reação de transcrição reversa acrescentado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica do teste, como limite de detecção, foi determinada utilizando como material de referência dois DNA plasmídicos contendo o produto de amplificação, cuja concentração inicial foi medida com espectrofotómetro (pP210 e pP190).

O DNA plasmídico pP210 foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5µL e a diluição foi utilizada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a P210 OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas P210	Negativas P210
10 cópias pP210	7	2	14	0

O DNA plasmídico P190 foi diluído a uma titulação de 10 cópias / 5µL e empregada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a P190 OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas P190	Negativas P190
10 cópias P190	7	2	14	0

Sensibilidade analítica: limite de detecção da ABL OligoMIX

A sensibilidade analítica desta OligoMIX permite identificar a presença de aproximadamente 100 moléculas de DNA branco nos 5 µL de cDNA produto da reação de transcrição reversa acrescentado à reação de amplificação.

A sensibilidade analítica do controle de idoneidade da amostra, como limite de detecção, foi determinada utilizando como material de referência o DNA plasmídico P210, que contém ainda o produto de amplificação ABL, cuja concentração inicial foi medida com espectrofotômetro.

O DNA plasmídico P210 foi diluído a uma titulação de 100 cópias / 5µL e a diluição foi utilizada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação único com a ABL OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas ABL	Negativas ABL
100 cópias P210	7	2	14	0

Sensibilidade diagnóstica: eficiência de detecção nos eventuais polimorfismos

A sensibilidade diagnóstica do teste, como eficiência de detecção nos diversos polimorfismos, foi avaliada pelo confronto de sequências com bancos de dados nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA P210 das **P210 OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados das regiões genômicas do rearranjo BCR-ABL e dos RNA mensageiros originados por este tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações significativas.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA P190 das **P190 OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados das regiões genômicas do rearranjo BCR-ABL e dos RNA mensageiros originados por este tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações significativas.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA ABL das **ABL OligoMIX** com as sequências disponíveis no banco de dados da região do gene codificante ABL tem demonstrado sua conservação e a ausência de mutações significativas.

Especificidade diagnóstica: amostras negativas

A especificidade diagnóstica do teste, como confirmação de amostras negativas, foi verificada realizando-se a análise de amostras de DNA genômico humano.

A especificidade diagnóstica foi avaliada utilizando como material de referência do DNA genômico humano, cuja concentração inicial foi medida no espectrofotômetro.

O DNA genômico humano foi diluído à concentração de 500ng / 5µL e a diluição foi utilizada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a P210 OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas P210	Negativas P210
500 ng DNA genômico	7	2	0	14

O DNA genômico humano foi diluído à concentração de 500ng / 5µL e a diluição foi utilizada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a P190 OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas P190	Negativas P190
500ng DNA genômico	7	2	0	14

O DNA genômico humano foi diluído à concentração de 500ng / 5µL e a diluição foi utilizada em duas repetições em sete diferentes sessões para realizar o procedimento de amplificação nested com a ABL OligoMIX, produzida por Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

Os resultados finais são resumidos na tabela seguinte:

Amostras	N° sessões	N° repetições	Positivas ABL	Negativas ABL
500ng DNA genômico	7	2	0	14

Especificidade analítica: marcadores potencialmente interferentes

A especificidade analítica do teste, como reatividade cruzada com outros marcadores potencialmente interferentes, foi avaliada para confronto de sequência com bancos de dados nucleotídicos.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA P210 das **P210 OligoMiX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genômicas humanas diferentes dos genes humanos BCR e ABL, entre as quais as do genoma humano completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA P190 das **P190 OligoMiX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genômicas humanas diferentes dos genes humanos BCR e ABL, entre as quais as do genoma completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

O exame do alinhamento das regiões selecionadas para a hibridação dos oligonucleotídeos primers para o cDNA ABL das **ABL OligoMIX** com as sequências disponibilizadas no banco de dados de regiões genômicas humanas diferentes pelo gene humano ABL, entre as quais as do genoma humano completo, demonstrou a especificidade do sistema de amplificação.

NOTA: Os dados e os resultados completos dos testes realizados para a avaliação das características do desempenho do produto estão registrados na Secção 7 do Fascículo Técnico do Produto "PHILADELPHIA oligomix Alert kit", FTP BANG07.

REFERÊNCIAS

VAN DONGEN J. J. M.. et al. (1999) *Leukemia* 13: 1901 - 1928

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490088

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:

20/12/2013

X

Mauricio Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon

CTRG07

Philadelphia - Controle Positivo

Instruções de Uso

USO PRETENDIDO

O produto «**Philadelphia - Controle Positivo** » é destinado ao uso como um controle positivo em ensaios qualitativos de amplificação de ácidos nucleicos para a **detecção do cDNA da translocação BCR-ABL, cromossomo Philadelphia, variantes P190, P210 e P230** com o produto «**Philadelphia oligomix Alert kit**» da Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

O produto **Controle Positivo** fornece uma solução estabilizada de plasmídeos contendo a sequência requerida, dividida em dois tubos de alíquotas prontas para uso. Cada tubo de teste contém 65 µL de solução, suficiente para 12 sessões.

Os plasmídeos contêm a região amplificada das translocações BCR-ABL, variantes P190 P210, e a região amplificada do gene controle ABL. A detecção do DNA alvo durante a reação de amplificação confirma a habilidade de identificar a presença do cDNA da translocação BCR-ABL e do gene controle ABL.

O kit possibilita a execução de 25 reações de amplificação usando 5µL por reação.

MATERIAIS FORNECIDOS

Componente	Descrição	Quantidade	Composição
P210 Controle Positivo	Solução de plasmídeo	**2 x 65 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
P 190 Controle Positivo	Solução de plasmídeo	**2 x 65 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura
ABL Controle Positivo	Solução de plasmídeo	**2 x 65 µL**	Plasmídeo, TRIS base, TRIS cloridrato, EDTA, RNA total de levedura

- Armazenar a -20°C ou inferior.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

- Fluxo laminar.
- Luvas descartáveis sem talco.
- Microcentrífuga de bancada (12.000 - 14.000 RPM).

- Micropipetas estéreis e ponteiras com filtro ou deslocamento positivo (0,5-10 µL, 2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL).
- Água bidestilada estéril.
- Real Time ABI PRISM 7000, completo com computador.

ACESSÓRIOS

Os reagentes para amplificação e detecção do DNA não estão inclusas neste produto. Para realizar estes passos analíticos, os produtos a seguir são recomendados:

- «**Philadelphia oligomix Alert kit**» (BANG07-02 / 05), kit de PCR nested para o cDNA da translocação BCR-ABL, cromossomo Philadelphia, variantes P190, P210 e P230 no produto de reação da transcrição reversa obtido da extração de RNA de amostras biológicas; total de 25 reações.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Este produto é exclusivamente para uso *in vitro*.

Advertências e precauções gerais

Manusear e descartar todas as amostras biológicas como potencialmente infecciosas. Evitar o contato direto com amostras biológicas. Evitar respingos. Os materiais que entram em contato com amostras biológicas devem ser tratados com hipoclorito de sódio 3% por, no mínimo, 30 minutos, ou autoclavados a 121°C por uma hora antes de serem descartados.

Manusear e descartar todos os reagentes e materiais como potencialmente infecciosos. Evitar contato direto com reagentes. Evitar respingos. Os resíduos devem ser tratados e descartados de acordo com normas de segurança. Resíduos líquidos contendo ácidos ou bases devem ser neutralizados antes do descarte.

Usar jaleco, luvas e óculos de proteção.

Nunca pipetar soluções com a boca.

Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho.

Lavar as mãos cuidadosamente após manusear amostras e reagentes.

Descartar as sobras de reagentes e resíduos de acordo com as normas de segurança.

Ler as instruções de uso antes de utilizar o produto. Seguir as instruções.

Não usar produtos após o prazo de validade estabelecido.

Somente usar os reagentes fornecidos no kit e aqueles recomendados pelo fabricante.

Não misturar reagentes de diferentes lotes.

Não utilizar reagentes de outros fabricantes.

Advertências e precauções de biologia molecular

Os procedimentos de biologia molecular, como a extração, a transcrição reversa, a amplificação e a detecção de ácidos nucleicos, requerem pessoal

especializado para prevenir o risco de resultados incorretos, em particular devido à degradação dos ácidos nucleicos das amostras ou devido à contaminação das amostras por produtos de amplificação.

É necessário dispor de uma área separada para a extração/preparação das reações de amplificação e para a amplificação/detecção dos produtos de amplificação (áreas de pré e pós-PCR). Nunca introduzir um produto de amplificação na área de extração/preparação das reações de amplificação.

É necessário uso de EPI adequado a cada uma das áreas de trabalho em laboratório de biologia molecular. Nunca transferir materiais da área de amplificação/detecção para a área de extração/preparação de reações.

As amostras devem ser empregadas exclusivamente a este tipo de análise. As amostras devem ser manipuladas em uma câmara de fluxo laminar. Os tubos que contêm amostras diferentes nunca devem ser abertos ao mesmo tempo. As pipetas utilizadas para manipular as amostras devem ser destinadas exclusivamente a este uso. As pipetas devem ser do tipo deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os reagentes devem ser manipulados em câmara de fluxo laminar. Os reagentes necessários para a amplificação devem ser preparados de modo a ser utilizados em uma única vez. As pipetas utilizadas para manipular os reagentes devem ser destinadas exclusivamente a este propósito. As pipetas devem ser do tipo de deslocamento positivo, ou usar ponteiras com barreira / filtro. As ponteiras utilizadas devem ser estéreis, sem a presença de DNAse e RNAse, sem a presença de DNA e RNA.

Os produtos de amplificação devem ser manipulados de modo a limitar ao máximo a dispersão no ambiente para evitar a possibilidade de contaminações. As pipetas utilizadas para manipular os produtos de amplificação devem ser destinadas exclusivamente para sua área de trabalho.

Advertências e precauções para componentes específicos

Os tubos contendo **Controle Positivo** podem ser congelados e descongelados por no máximo 12 vezes. Um número maior de ciclos de congelamento e descongelamento pode causar uma redução do título.

O **Controle Positivo** apresenta as seguintes advertências (S):

S 23-25 Não inalar vapores. Evitar contato com os olhos.

PROCEDIMENTO

O produto « **Philadelphia - Controle Positivo** » deve ser usado com o produto **«Philadelphia oligomix Alert kit».**

O **Controle Positivo** está pronto para o uso, portanto deve ser usado adicionando 5 µL diretamente na mistura de reação.

O procedimento completo envolve preparação e execução de reação de amplificação com termociclador com sistema óptico de detecção de fluorescência. É descrito em detalhes nas instruções de uso do produto «**Philadelphia oligomix Alert kit**»**,** bem como informações sobre as características de desempenho e limitações do procedimento.

NOTA: O **Controle Positivo** pode ser congelado e descongelado por no máximo 12 vezes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GABERT J. et al. (2003) *Leukemia* 17: 2318 - 2357
BEILLARD E. et al. (2003) *Leukemia* 17: 2474 - 2486

IDENTIFICAÇÃO DO DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360
Tel.: (41) 2108-5250
Fax: (41) 2108-5252
DDG: 0800-7260504
E-mail: biometrix@biometrix.com.br
Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

Nanogen Advanced Diagnostics S.P.A.
C.so Torino, 89/d - 10090 Buttigliera Alta (TO) - Itália

REGISTRO ANVISA

80298490087

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira
CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
20/12/2013

X

Mauricio Cichon
Laboratório
Assinado por: Maurício Cichon